

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. Juli 2003 (24.07.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/059062 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A01N 33/08 (74) Gemeinsamer Vertreter: LONZA AG; Münchensteiner-
// (A01N 33/08, 39:00, 33:12, 33:04) strasse 38, CH-4052 Basel (CH).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/00378 (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
16. Januar 2003 (16.01.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
02001329.8 18. Januar 2002 (18.01.2002) EP
60/349,994 23. Januar 2002 (23.01.2002) US
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): LONZA AG [CH/CH]; Münchensteinerstrasse 38,
CH-4052 Basel (CH).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LICHTENBERG, Flo-
rian [DE/DE]; Röttler Ring 12, 79639 Grenzach-Wyhlen
(DE). LÜTZELER, Michael [DE/DE]; Kolpingstrasse
12c, 79639 Grenzach-Wyhlen (DE). RANFT, Volker
[DE/DE]; Ledergasse 3, 79730 Murg (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE, SI, SK, TR). OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

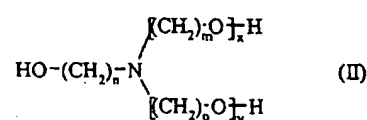
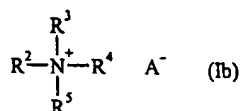
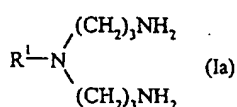
Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die
folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: VIRUCIDAL DISINFECTANT

(54) Bezeichnung: VIRUZIDE DESINFEKTIONSMITTEL



(57) Abstract: Disclosed is the use of disinfectant compositions as a virucide, particularly against polio viruses, containing a) at least one amine and/or quaternary ammonium salt of general formula (1a) or (1b), in which R¹ represents C₆₋₁₈ alkyl, R² represents benzyl or C₆₋₁₈ alkyl, R³ represents C₁₋₁₈ alkyl or -[(CH₂)₂-O]_nR⁶, with n = 1-20, R⁴ and R⁵ independently represent C₁₋₄ alkyl, R⁶ represents hydrogen or optionally substituted phenyl, and A⁻ represents a monovalent anion or an equivalent of a polyvalent anion of an inorganic or organic acid; and b) at least one alkanolamine of general formula (II), in which n and optionally m and x independently have the value 2 or 3 and y independently have the value 0 or 1, or a corresponding salt; at a mass ratio I:II of 20:1 to 1:20. Said compositions also have good bactericidal and fungicidal qualities, even when used at low concentrations.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird die Verwendung von Desinfektionsmittelzusammensetzungen, die a) wenigstens ein Amin und/oder quartäres Ammoniumsalz der allgemeinen Formel (1a) oder (1b), worin R¹ C₆₋₁₈-Alkyl, R² Benzyl oder C₆₋₁₈-Alkyl, R³ C₁₋₁₈-Alkyl oder -[(CH₂)₂-O]_nR⁶ mit n = 1-20, R⁴ und R⁵ unabhängig voneinander C₁₋₄-Alkyl, R⁶ Wasserstoff oder gegebenenfalls substituiertes Phenyl und A⁻ ein einwertiges Anion oder ein Äquivalent eines mehrwertigen Anions einer anorganischen oder organischen Säure bedeutet; und b) wenigstens ein Alkanolamin der allgemeinen Formel (II), worin n und, soweit vorhanden, m und o unabhängig voneinander den Wert 2 oder 3 und x und y unabhängig voneinander den Wert 0 oder 1 haben, oder ein entsprechendes Salz; im Massenverhältnis I:II von 20:1 bis 1:20 enthalten, als Viruzid, insbesondere gegen Polioviren. Die Zusammensetzungen besitzen ausserdem gute bakterizide und fungizide Wirksamkeit auch bei geringen Anwendungskonzentrationen.

WO 03/059062 A1



GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Viruzide Desinfektionsmittel

Die Erfindung betrifft die Verwendung von synergistischen Desinfektionsmittel-
zusammensetzungen auf Basis von Aminen und/oder quartären Ammoniumsalzen als
5 viruzide Mittel, insbesondere gegen Polioviren.

Es sind zahlreiche Desinfektions- und Konservierungsmittelzusammensetzungen auf Basis
von Aminen und/oder quartären Ammoniumsalzen bekannt. Diese weisen jedoch im
allgemeinen, insbesondere bei höheren Verdünnungen, eine unbefriedigende Wirksamkeit
10 gegen Pilze wie z. B. *Aspergillus niger* und Viren (insbesondere gegen hochresistente
Viren wie z. B. Polioviren) auf.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung von Desinfektionsmittel-
zusammensetzungen auf Basis von Aminen und/oder quartären Ammoniumsalzen, welche
15 auch bei hoher Verdünnung eine gute Wirksamkeit gegen Pilze und insbesondere gegen
Viren aufweisen.

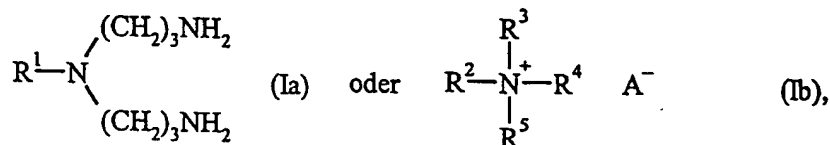
Erfindungsgemäss wird diese Aufgabe durch die Verwendung nach Patentanspruch 1
gelöst.

20

Die ältere Anmeldung PCT/EP 01/10754 (publiziert als WO 02/23990 A1) beschreibt
Desinfektionsmittelzusammensetzungen auf Basis von Aminen und/oder quartären
Ammoniumsalzen und Alkanolaminen und deren fungizide Eigenschaften.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass solche Desinfektionsmittelzusammensetzungen
25 auch ausgeprägte viruzide Eigenschaften und insbesondere auch eine gute Wirksamkeit
gegen hochresistente Viren wie Polioviren aufweisen. Ebenfalls wirksam sind sie gegen
andere Picornaviren wie beispielsweise ECHO-Viren oder entsprechende tierpathogene
Viren wie ECBO-Viren sowie gegen Parvoviren wie beispielsweise Canine Parvovirus.

30 Die Zusammensetzungen umfassen Amine und/oder quartäre Ammoniumsalze der
allgemeinen Formel



worin R^1 C_{6-18} -Alkyl,

R^2 Benzyl oder C_{6-18} -Alkyl

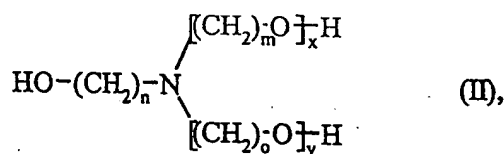
5 R^3 C_{1-18} -Alkyl oder $\text{---}[(\text{CH}_2)_2\text{O}]_n\text{R}^6$ mit $n = 1-20$

R^4 und R^5 unabhängig voneinander C_{1-4} -Alkyl

R^6 Wasserstoff oder gegebenenfalls substituiertes Phenyl

und A^- ein einwertiges Anion oder ein Äquivalent eines mehrwertigen Anions einer anorganischen oder organischen Säure bedeutet;

10 und wenigstens ein Alkanolamin der allgemeinen Formel



worin n und, soweit vorhanden, m und o unabhängig voneinander den Wert 2 oder 3

15 und x und y unabhängig voneinander den Wert 0 oder 1 haben, oder einem entsprechenden Salz; im Massenverhältnis I:II von 20:1 bis 1:20.

Unter Alkyl sind hier und im folgenden jeweils lineare oder verzweigte Alkylgruppen der angegebenen Kohlenstoffzahlen zu verstehen, vorzugsweise jedoch lineare Alkylgruppen
 20 und besonders bevorzugt solche mit gerader Zahl von Kohlenstoffatomen. Insbesondere sind hierunter auch die von natürlichen Rohstoffen abgeleiteten Homologengemische wie beispielsweise „Kokosalkyl“ zu verstehen.

Unter substituiertem Phenyl sind insbesondere mit einer oder mehreren C_{1-8} -Alkylgruppen
 25 und/oder Chloratomen substituierte Phenylgruppen zu verstehen.

Als Anion A^- eignen sich grundsätzlich alle anorganischen oder organischen Anionen, insbesondere Halogenid wie beispielsweise Chlorid oder Bromid oder Anionen niedriger

Carbonsäuren wie beispielsweise Acetat, Propionat oder Lactat.

- Das Amin bzw. quartäre Ammoniumsalz (Ia/Ib) ist vorzugsweise *N,N*-Bis(3-aminopropyl)-dodecylamin, *N,N*-Bis(3-aminopropyl)octylamin, ein Didecyl-dimethylammoniumsalz,
- 5 Diocetyl-dimethylammoniumsalz, Octyl-decyl-dimethylammoniumsalz, Dikokosalkyl-dimethylammoniumsalz, Kokosalkyl-dimethyl-poly(oxyethyl)ammoniumsalz, Dikokosalkyl-methyl-poly(oxyethyl)ammoniumsalz, Decyl-dimethyl-poly(oxyethyl)ammoniumsalz, Didecyl-methyl-poly(oxyethyl)ammoniumsalz, Octyl-dimethyl-poly(oxyethyl)ammoniumsalz, Dioctyl-methyl-poly(oxyethyl)ammoniumsalz, Kokosalkyl-dimethyl-benzyl-
- 10 ammoniumsalz, Benzyl-dodecyl-dimethylammoniumsalz oder Benzyl-dimethyl-poly(oxyethyl)ammoniumsalz oder ein Gemisch von zweien oder mehreren dieser Verbindungen. Besonders gute Ergebnisse wurden mit Didecyl-dimethylammoniumsalzen erzielt.

- Als Alkanolamine (II) eignen sich grundsätzliche alle Ethanol- und Propanolamine,
- 15 insbesondere Monoethanolamin, Diethanolamin, Triethanolamin und 3-Amino-1-propanol. Es liegt selbstverständlich auch im Rahmen der Erfindung, Gemische der genannten Verbindungen einzusetzen. Besonders gute Ergebnisse wurden mit den Verbindungen mit primärer Aminogruppe erhalten, nämlich mit Monoethanolamin und 3-Amino-1-propanol.

- 20 Das Massenverhältnis von Amin (Ia) bzw. quartärem Ammoniumsalz (Ib) zu Alkanolamin (II) liegt vorzugsweise im Bereich von 1:5 bis 5:1.

- Die erfindungsgemäss verwendeten Desinfektionsmittelzusammensetzungen enthalten vorzugsweise Wasser als Lösungsmittel, gegebenenfalls in Kombination mit einem
- 25 organischen Lösungsmittel.

- Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäss verwendeten Desinfektionsmittelzusammensetzungen noch einen oder mehrere Hilfsstoffe aus der Gruppe bestehend aus organischen Lösungsmitteln, Tensiden, Komplexbildnern, Duftstoffen und Farbstoffen.

30

Eine bevorzugte Verwendung der Desinfektionsmittelzusammensetzungen ist die Flächen- und Instrumentendesinfektion.

Weitere bevorzugte Verwendungsgebiete sind die Wäschedesinfektion und die Händedesinfektion.

Eine weitere bevorzugte Verwendung der Desinfektionsmittelzusammensetzungen ist der Einsatz in chemischen Toiletten wie beispielsweise an Bord von Flugzeugen und Fahrzeugen.

Die folgenden Beispiele verdeutlichen die Ausführung der Erfindung, ohne dass darin eine Beschränkung auf die beschriebenen Ausführungsformen zu sehen ist. Alle Mengenangaben sind, soweit nicht anders angegeben, in Massen-%. Als Testkeim wurde jeweils *Aspergillus niger* ATCC 16404 eingesetzt. Die Wirksamkeit wurde, soweit nichts anderes angegeben ist, nach dem in CEN 1275 spezifizierten Verfahren bestimmt.

Beispiel 1

Es wurde eine Desinfektionsreinigerformulierung (Konzentrat) hergestellt aus:

- 5,0% Didecyldimethylammoniumchlorid (50%ige Lösung)
- 2,0% *N,N*-Bis(3-aminopropyl)dodecylamin
- 5,0% Monoethanolamin
- 5,0% Genapol® T250 (Talgfettalkoholpolyglycolether, 25 mol Ethylenoxid)
- 0,5% Natriummetasilicat
- 0,5% Natriumcarbonat
- 2,0% Methylglycindiessigsäure-Trinatriumsalz (Trilon® M; 40%ige Lösung)
- Wasser ad 100%

Die Wirksamkeit wurde mit einer Verdünnung (1 Teil Konzentrat, 99 Teile Wasser) bei 20 °C und 15 min Kontaktzeit bestimmt. Der dekadische Logarithmus der Keimzahlreduktion war 4,1.

Vergleichsbeispiel 1

Es wurde wie in Beispiel 1 verfahren, jedoch mit dem Unterschied, dass das Monoethanolamin durch die gleiche Menge Wasser ersetzt wurde. Unter den gleichen Testbedingungen
5 war die Formulierung praktisch unwirksam.

Beispiel 2

10 Es wurde eine Desinfektionsmittelformulierung (Konzentrat) hergestellt aus:

4,9% *N,N*-Bis(3-aminopropyl)dodecylamin

4,0% Monoethanolamin

2,0% Genapol® T250 (Talgfettalkoholpolyglycolether, 25 mol Ethylenoxid)

15 5,0% Hostapur® SAS 30 (C₁₃₋₁₇ sekundäre *n*-Alkansulfonsäure, Natriumsalz)

2,0% Ethylendiamintetraessigsäure-Tetranatriumsalz (40%ige Lösung)

0,7% Ethylendiamintetraessigsäure

Wasser ad 100%

20 Die Wirksamkeit wurde mit einer Verdünnung (1 Teil Konzentrat, 199 Teile Wasser) bei 20 °C und 15 min Kontaktzeit bestimmt. Der dekadische Logarithmus der Keimzahlreduktion war 4,3.

25 **Beispiel 3**

Es wurde eine Desinfektionsmittelformulierung (Konzentrat) hergestellt aus:

4,2% *N,N*-Bis(3-aminopropyl)dodecylamin

30 2,0% Didecyl-methyl-poly(oxyethyl)ammoniumpropionat (BARDAP 26)

4,0% Monoethanolamin

2,0% Genapol® T250 (Talgfettalkoholpolyglycolether, 25 mol Ethylenoxid)

5,0% Hostapur® SAS 30 (C₁₃₋₁₇ sekundäre *n*-Alkansulfonsäure, Natriumsalz)

- 2,0% Ethylendiamintetraessigsäure-Tetranatriumsalz (40%ige Lösung)
- 0,7% Ethylendiamintetraessigsäure
- 4,0% Butyldiglycol
- Wasser ad 100%

5

Die Wirksamkeit wurde mit einer Verdünnung (1 Teil Konzentrat, 199 Teile Wasser) bei 20 °C und 15 min Kontaktzeit bestimmt. Der dekadische Logarithmus der Keimzahlreduktion war >4,4.

- 10 Zusätzlich wurde die Wirksamkeit noch nach dem in CEN 1650 spezifizierten Verfahren bei einer Kontaktzeit von 15 min, einer Konzentration von 1,0%, einer Wasserhärte von 30 °fH und einer organischen Belastung von 0,3% Albumin bestimmt. Der dekadische Logarithmus der Keimzahlreduktion war >4,4.

15 **Beispiele 4–19**

Es wurden wässrige Lösungen aus 0,5% Alkanolamin (II) und 0,25% Amin bzw. quartäres Ammoniumsalz (Ia/Ib) hergestellt und nach dem in CEN 1275 spezifizierten Verfahren getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefasst.

20

Tabelle 1

Beispiel Nr.	Amin/Ammoniumsalz	Alkanolamin	log ₁₀ Keimreduktion
4	Dimethyl-dioctyl-ammoniumchlorid	Monoethanolamin	4,3
5	dto.	Diethanolamin	4,0
6	dto.	Triethanolamin	3,6
7	dto.	3-Amino-1-propanol	4,2
8	Didecyl-dimethyl-ammoniumchlorid	Monoethanolamin	4,0
9	dto.	Diethanolamin	3,8
10	dto.	Triethanolamin	3,1
11	dto.	3-Amino-1-propanol	4,0
12	Di-C ₈₋₁₀ -alkyldimethyl-ammoniumchlorid (60%) / C ₁₂₋₁₆ -Alkyl-benzyl-dimethylammoniumchlorid (40%); Bardac® 205-M	Monoethanolamin	3,9
13	dto.	Diethanolamin	3,2
14	dto.	Triethanolamin	2,8
15	dto.	3-Amino-1-propanol	3,8
16	<i>N,N</i> -Bis(3-aminopropyl)-dodecylamin	Monoethanolamin	2,9
17	dto.	Diethanolamin	2,7
18	dto.	Triethanolamin	2,4
19	dto.	3-Amino-1-propanol	2,8

Zum Vergleich wurden alle in Tabelle 1 aufgeführten Verbindungen als Einzelsubstanzen in 0,5%iger Lösung getestet. Keine dieser Verbindungen wies eine ausgeprägte fungizide Wirkung auf (log₁₀ Keimreduktion <2).

Beispiel 20

Es wurde eine Desinfektionsmittelformulierung (Konzentrat) hergestellt aus:

- 5 9,9% Didecyl-dimethylammoniumchlorid (70%ige Lösung)
- 8,0% Monoethanolamin
- 5,0% Genapol® T250 (Talgfettalkoholpolyglycoether, 25 mol Ethylenoxid)
- 5,0% Kaliumcarbonat (wasserfrei)
- 6,0% Ethylendiamintetraessigsäure-Tetranatriumsalz (Trilon® B; 40%ige Lösung)
- 10 Wasser ad 100%

Beispiel 21

- 15 Das in Beispiel 20 beschriebene Konzentrat wurde in 6%iger Verdünnung in
Suspensionsversuch mit einer Einwirkzeit von 30, 60 und 120 Minuten auf Wirksamkeit
gegen Poliovirus Typ 1 (Stamm Mahoney) geprüft.

Testmethode:

- 20 Die Prüfung erfolgte in Anlehnung an die „Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der
Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten zur Prüfung von
chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren“ (*Bundesgesundheitsbl.*
1982, 25, 397). Als Wachstumsmedium zur Vermehrung der Vero-Zellkulturen diente
„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“, dem 10% fetales Kälberserum und 10 U/ml
25 Penicillin sowie 10 µg/ml Streptomycin zugegeben war. Nach Inokulation der Gewebe-
kultur mit Polio-Virus enthielt das Gewebekulturmedium nur noch 3% fetales Kälber-
serum. Nach fast vollständiger Ablösung Polio-infizierter Zellen wurde die Virussus-
pension durch Abzentrifugieren von Zellen und Zellbestandteilen (3000×g, 15 min)
gereinigt. Da das Medium der Zellkultur 3% fetales Kälberserum enthielt, war auch bei der
30 Desinfektionsmittelprüfung auch in den Testansätzen mit bidestilliertem Wasser eine
geringe Eiweissbelastung vorhanden.
Zur Desinfektionsmittelprüfung wurde 1 Teil der Virussuspension mit 8 Teilen einer
7,5%igen Verdünnung des Desinfektionsmittelkonzentrats (entsprechend einer End-

- konzentration von 6%) und jeweils 1 Teil Aqua bidest. oder 2%igem Serumalbumin oder fetalem Kälberserum gemischt und für 30, 60 und 120 min bei 20 °C inkubiert. Dann wurde die Wirkung des Desinfektionsmittels durch 100fache Verdünnung mit kaltem Medium, das kein fetales Kälberserum enthielt, gestoppt. Mit jeweils 1 ml dieser
- 5 Verdünnung (entsprechend einer Verdünnung der Virussuspension auf 10^{-3}) und weiteren dekadischen Verdünnungsstufen wurden jeweils 2 Schälchen von Multiwellplatten mit 6 Vertiefungen (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, Typ Falcon™ 353046), die einen dichten Zellrasen von Vero-Zellen enthielten, inokuliert. Nach 1 h Adsorptionszeit bei Raumtemperatur wurde die überstehende Flüssigkeit abgesaugt. Dann wurde der
- 10 Zellrasen der Schälchen mit 2 ml 2%iger, durch Kochen verflüssigter Agarose (Serva high EEO, Kat.-Nr. 11397), die mit doppelt konzentriertem Medium mit 5%igem fetalem Kälberserum im Verhältnis 1:1 gemischt und im Wasserbad auf 40 °C abgekühlt worden war, überschichtet. Nach Erstarren der Agarose bei Raumtemperatur wurden die Platten bei 37 °C im CO₂-Brutschrank für 2 Tage inkubiert.
- 15 Die Prüfung der Infektiosität der Virussuspension erfolgte im Plaque-Test. Dabei entspricht jedes Areal an zerstörten Zellen einer infektiösen Einheit des Poliovirus. Die Zahl der Plaques zeigt somit die Zahl der in einer bestimmten Verdünnung des Versuchsansatzes vorhandenen infektiösen Viruspartikel an. Die Plaques werden durch Anfärbung mit jeweils 1,0 ml einer Lösung von 0,1% Brilliant Blue R (Sigma, Kat.-Nr. B0149) in einer
- 20 wässrigen Lösung mit 20% Methanol und 5% Essigsäure für 30 min sichtbar gemacht. Die ungefärbten Plaques heben sich anschliessend vom blau gefärbten Zellrasen deutlich ab. Aus jeweils zwei Ansätzen einer Verdünnung wurde ein Mittelwert der Plaquezahl errechnet.
- Als „Viruskontrollen“, in denen die Ausgangskonzentration des Virus bestimmt wurde, dienten Ansätze, in denen das Desinfektionsmittel durch das gleiche Volumen bidestilliertes Wasser ersetzt war. Die so ermittelte Viruskonzentration diente als Referenzwert für
- 25 die Berechnung der virusinaktivierenden Wirkung der getesteten Desinfektionsmittel. Als „Toxizitätskontrollen“ zum Nachweis einer eventuellen Schädigung der Gewebekulturzellen durch das Desinfektionsmittel dienten Ansätze, in denen die Virussuspension durch das gleiche Volumen bidestilliertes Wasser ersetzt war. Diese Ansätze wurden im
- 30 Verhältnis 1:100 und 1:1000 (entsprechend einer Verdünnung der Virussuspension von 10^{-3} bzw. 10^{-4} im Desinfektionsmittel-Testansatz) mit Medium ohne fetales Kälberserum verdünnt. Dann wurden sie wie die Ansätze zum Test der Desinfektionswirkung für 1 h der

Gewebekultur zugegeben und dann abgezogen. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37 °C wurde durch Anfärbung geprüft, ob der Zellrasen durch das Desinfektionsmittel geschädigt worden war.

- Als Hinweis auf die Resistenz des Prüfvirus und zur Vergleichbarkeit mit anderen Untersuchungen wurde eine „Formaldehydkontrolle“ mitgeführt. Dazu wurde 1 Teil der Virus-
- 5 suspension mit 4 Teilen phosphatgepufferter Kochsalzlösung (0,1 M; pH 7; „Dulbecco's PBS“) gemischt und die gleiche Menge einer 1,4 g Formaldehyd in 100 ml Lösung enthaltenden Formalinlösung (Endkonzentration: 0,7 g HCHO/100 ml) zugegeben. Nach 5, 15 und 60 min Einwirkzeit wurde die Wirksamkeit des Formaldehyds wie beim Desinfektionsmitteltest durch eine Verdünnung auf 1:100 gestoppt und die verbliebene Infektiosität des Poliovirus in weiteren dekadischen Verdünnungen im Plaque-Test bestimmt.
- 10

Ergebnisse:

Kontrollexperimente:

- 15 Die „Viruskontrolle“ ergab im Ansatz mit bidestilliertem Wasser eine Viruskonzentration von $1,6 \cdot 10^8$ infektiösen Einheiten/ml, im Ansatz mit Serumalbumin $1,2 \cdot 10^8$ infektiösen Einheiten/ml und im Ansatz mit fetalem Kälberserum $1,0 \cdot 10^8$ infektiösen Einheiten/ml. Die „Toxizitätskontrolle“ zeigte nach der Verdünnung des Prüfansatzes auf 1:100 (entsprechend einer Verdünnung der Virussuspension von 10^{-3}) eine leichte Schädigung des
- 20 Zellrasens. Bei einer Verdünnung von 1:1000 war keine Toxizität mehr erkennbar. Somit kann unter den Testbedingungen eine Abnahme der Viruskonzentration unter Desinfektionsmitteleinwirkung bis zu einer Viruskonzentration von $5 \cdot 10^3$ infektiöse Einheiten/ml in der Virussuspension (in beiden Schälchen der Verdünnung 10^{-4} ist dann kein Plaque mehr sichtbar) verfolgt werden und bei einer Ausgangskonzentration von mindestens 10^8
- 25 infektiösen Viruspartikeln/ml ist eine Abnahme der Viruskonzentration über mindestens 4,5 Zehnerpotenzen beobachtbar. Da die Prüfrichtlinie zum Nachweis der Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels nur eine Abnahme der Viruskonzentration um wenigstens 4 Zehnerpotenzen verlangt, ist die Erfüllung dieser Bedingung mit dem gewählten Versuchs-
- 30 ansatz überprüfbar.
- Im Ansatz mit 0,7%igem Formaldehyd wurde nach 5 min Einwirkzeit eine Viruskonzentration von $1,05 \cdot 10^6$ /ml, nach 15 min $1 \cdot 10^3$ /ml und nach 60 min $\leq 5 \cdot 10^2$ /ml gemessen. Dies sind erwartete Werte, die die Resultate früherer Versuche bestätigen: 0,7%iges Formalin

ist normalerweise in der Lage, die Konzentration von Poliovirus innerhalb von 30 min um mehr als 4 Zehnerpotenzen zu reduzieren.

Wirksamkeit der Desinfektionsmittel gegen Poliovirus:

- 5 Nach 30, 60 und 120 min Einwirkung von 6%iger Verdünnung der Desinfektionsmittelzusammensetzung aus Beispiel 20 wurde im Ansatz mit fetalem Kälberserum bei der Virusverdünnung 10^{-4} jeweils in beiden Testschälchen kein Plaque mehr beobachtet. Somit ist nach der Desinfektionsmittelbehandlung eine Viruskonzentration von $\leq 5 \cdot 10^3$ infektiöse Einheiten/ml vorhanden. Dieses Ergebnis wurde sowohl bei geringer (Ansatz mit Aqua
- 10 bidest.) als auch mittlerer (Ansatz mit 2%igem Serumalbumin) und hoher (Ansatz mit fetalem Kälberserum) Eiweissbelastung gefunden. Es war damit im Vergleich zur Kontrollbestimmung ohne Desinfektionsmittel zu einer Abnahme der Viruskonzentration um mindestens 4,5 \log_{10} -Stufen bzw. Zehnerpotenzen gekommen.
- 15 Damit ist die Wirksamkeitsvoraussetzung für die Registrierung als Instrumentendesinfektionsmittel in der Bundesrepublik Deutschland erfüllt.

Beispiel 22

- 20 Wirksamkeit gegen ECBO-Viren:

Das in Beispiel 20 beschriebene Konzentrat wurde in Anlehnung an die Richtlinie des (deutschen) Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren (*Bundesgesundheitsbl.* 1982, 25, 397–398; Kommentar: *Bundesgesundheitsbl.*

25 1983, 26, 413–414) im quantitativen Suspensionsversuch auf seine viruziden Eigenschaften gegenüber dem ECBO-Virus Stamm LCR-4 getestet. Untersucht wurden Verdünnungen von 1,0%, 3,0% und 5,0% des Konzentrats in bidestilliertem Wasser bei Einwirkzeiten von 15, 30, 60 und 120 min.

Die Prüftemperatur betrug 20 ± 1 °C, als Eiweissbelastung wurde fetales Kälberserum

30 (FKS) oder Serumalbumin (bovine serum albumin, BSA) verwendet.

Zur Herstellung der Virussuspension wurden fetale Kälberlungenzellen (FKL 107) in Roux-Flaschen mit Minimum Essential Medium (MEM, Eagle) mit ca. 10 PBE (Plaque bildende Einheiten) des Virus (erhalten von Dr. W. Herbst, Institut für Hygiene und

Infektionskrankheiten der Tiere an der Justus-Liebig-Universität in Giessen) pro Zelle infiziert und nach Erscheinen des cytopathischen Effekts (ca. 12 h) einem dreifachen Einfrier-/Auftauvorgang unterworfen. Es folgte eine Zentrifugation bei $770 \times g$ für 10 min, welche die Virussuspension als Überstand lieferte.

- 5 Zur Herstellung der Inaktivierungsansätze wurden 8 Volumenteile des Desinfektionsmittels in der 1,25fachen gewünschten Konzentration mit Virussuspension und bidestilliertem Wasser (je 1 Volumenteil) vermischt. Bei den Versuchen mit Eiweissbelastung wurde anstelle des bidestillierten Wassers ein Volumenteil FKS (Flow Laboratories) bzw. 2%ige BSA-Lösung (Behringwerke AG) verwendet.

- 10 Die Durchführung der Inaktivierungsversuche erfolgte in geschlossenen Glasröhrchen. Nach den entsprechenden Zeiten wurde Proben entnommen, um die Restinfektiosität zu bestimmen.

Die Bestimmung der Infektiosität erfolgte mit Hilfe der Endverdünnungstitration im Mikroverfahren. Dazu wurden die Proben unmittelbar nach ihrer Entnahme mit Minimum

- 15 Essential Medium (MEM) verdünnt, wobei als Verdünnungsfaktoren ganzzahlige Potenzen von 10 gewählt wurden. Jeweils 100 μ l einer verdünnten Probe wurden in 8 Näpfe einer sterilen Polystyrolplatte mit flachem Boden übergeführt. Dann wurden jeweils 100 μ l einer frisch trypsinierten Suspension von KOP-R-Zellen (Ösopharynxgewebe vom Rind, erhalten von Dr. R. Riebe, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere auf der Insel Riems, Katalog-Nr. RIE 244) zugegeben. Diese Suspension war so eingestellt, dass sich in jedem Napf ca. $10-15 \times 10^3$ Zellen befanden. Danach wurden die Proben bei 37 °C im CO₂-Brutschrank (5 Vol% CO₂) inkubiert. Nach 5 bis 7 Tagen wurde nach der Methode von Spearman-Kärber die infektiöse Dosis (ID₅₀/ml) bestimmt.

- 20 Die Beurteilung der viruziden Wirkung erfolgte durch Berechnung des Titerabfalls gegenüber den jeweils parallel (nach der längsten Einwirkzeit) durchgeführten Kontrolltitrationen. Die Differenz wurde als $\Delta \log_{10} \text{ID}_{50}$ angegeben.

- Für die Bestimmung der Cytotoxizität des Desinfektionsmittels wurden 2 Volumenteile PBS (phosphate buffered saline) mit 8 Volumenteilen der Desinfektionsmittel-Verdünnung (1,25fache Konzentration) gemischt, entsprechend verdünnt und auf die Zellkulturen
30 gebracht. Die Angabe der cytotoxischen Dosis erfolgte als $\log_{10} \text{CD}_{50}/\text{ml}$ (in Analogie zum ID₅₀-Wert).

Die Ergebnisse der Inaktivierungsversuche sind in der folgenden Tabelle 2 zusammengefasst, diejenigen der Cytotoxizitätsbestimmung in Tabelle 3.

Tabelle 2

Konzentration	Virusgehalt (Kontrolle) (log ₁₀ ID ₅₀ /ml)	Eiweiss- belastung	Abnahme des Infektionstiters (Δlog ₁₀ ID ₅₀) nach			
			15 min	30 min	60 min	120 min
1,0%	6,85	—	1,25	1,25	1,64	n.d.
1,0%	7,05	0,2% BSA	1,00	1,25	1,34	n.d.
1,0%	7,15	10,0% FKS	1,00	1,15	1,25	n.d.
3,0%	7,65	—	≥4,15	≥4,15	≥4,15	≥4,15
3,0%	7,75	0,2% BSA	3,45	≥4,25	≥4,25	≥4,25
3,0%	7,65	10,0% FKS	2,17	3,45	≥4,15	≥4,15
5,0%	7,65	—	≥4,15	≥4,15	≥4,15	≥4,15
5,0%	7,75	0,2% BSA	4,05	≥4,25	≥4,25	≥4,25
5,0%	7,65	10,0% FKS	3,15	≥4,15	≥4,15	≥4,15

n.d. = nicht durchgeführt

Tabelle 3

Konzentration	Verdünnungsstufe				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1,0%	+	—	—	—	—
3,0%	+	+	—	—	—
5,0%	+	+	—	—	—

5

Die Ergebnisse zeigen, dass die getestete Zusammensetzung (Konzentrat) bei einer Anwendungskonzentration von 3,0% nach 60 min Einwirkzeit und bei 5,0% nach 30 min die in der Richtlinie definierte Wirksamkeit (Δlog₁₀ ID₅₀ ≥ 4,0; entsprechend einer Inaktivierung von ≥99,99%) gegen ECBO-Viren aufweist.

10

Beispiel 23

Wirksamkeit gegen Canine Parvovirus:

Verdünnungen des in Beispiel 20 beschriebenen Konzentrats wurden auf ihre Wirksamkeit
5 gegen Canine Parvovirus Typ 2 (bezogen von Dr. Parrish, Cornell University) in NLFK-
Zellen (Norden Lab Feline Kidney) bei 22 °C und 10 min Einwirkzeit getestet.

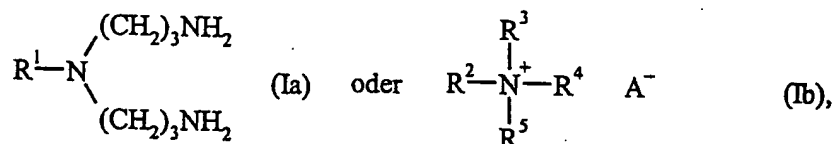
Verdünnungen im Verhältnis 1:35 in entsalztem oder hartem (400 ppm AOAC hard water)
Wasser mit 5% organischer Belastung (fetales Kälberserum) zeigten hinreichende viruzide
Wirksamkeit.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Desinfektionsmittelzusammensetzung, enthaltend

a) ein Amin und/oder quartäres Ammoniumsalz der allgemeinen Formel

5



worin R^1 C_{6-18} -Alkyl,

R^2 Benzyl oder C_{6-18} -Alkyl,

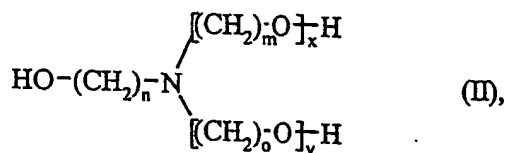
10 R^3 C_{1-18} -Alkyl oder $-(\text{CH}_2)_x\text{O}_n\text{R}^6$ mit $n = 1-20$,

R^4 und R^5 unabhängig voneinander C_{1-4} -Alkyl,

R^6 Wasserstoff oder gegebenenfalls substituiertes Phenyl

und A^- ein einwertiges Anion oder ein Äquivalent eines mehrwertigen Anions einer anorganischen oder organischen Säure bedeutet; und

15 b) wenigstens ein Alkanolamin der allgemeinen Formel



worin n und, soweit vorhanden, m und o unabhängig voneinander den Wert 2 oder 3

20 und x und y unabhängig voneinander den Wert 0 oder 1 haben, oder ein entsprechendes Salz;

im Massenverhältnis I:II von 20:1 bis 1:20

als viruzides Mittel.

25 2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Amin bzw. quartäre Ammoniumsalz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus *N,N*-Bis-(3-amino-propyl)dodecylamin, *N,N*-Bis(3-aminopropyl)octylamin, Didecyl-dimethylammoniumsalzen, Dioctyl-dimethylammoniumsalzen, Octyl-decyl-dimethylammoniumsalzen,

Kokosalkyl-dimethyl-benzylammoniumsalzen und Benzyl-dimethyl-oxethyl-ammoniumsalzen sowie Gemischen dieser Verbindungen.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Alkanolamin
5 (II) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Monoethanolamin, Diethanolamin, Triethanolamin und 3-Amino-1-propanol.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das
Massenverhältnis I:II zwischen 1:5 und 5:1 liegt.
- 10 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Desinfektionsmittelzusammensetzung Wasser als Lösungsmittel enthält.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die
15 Desinfektionsmittelzusammensetzung zusätzlich einen oder mehrere Hilfsstoffe aus der Gruppe bestehend aus organischen Lösungsmitteln, Tensiden, Komplexbildnern, Duftstoffen und Farbstoffen enthält.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in der Flächen- und Instrumenten-
20 desinfektion.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in der Wäschedesinfektion.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in der Händedesinfektion.
- 25 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in chemischen Toiletten.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 gegen Parvo- oder Picomaviren, insbesondere gegen Polioviren.